

Д. А. Гусаров^{1, 2}, Д. В. Бырихина², Ф. М. Ижаева^{1, 2}, А. И. Государев^{1, 2},
П. В. Михайлов², В. Д. Гусарова², Т. А. Будыльская², А. Ф. Миронов¹, В. И. Швец¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМНОГО ПОДХОДА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ (НА ПРИМЕРЕ ИНСУЛИНА-ГЛАРГИНА)

¹ Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, 119571 Москва, проспект Вернадского 86, Россия

² Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, 123098 Москва, ул. Гамалеи 18, Россия; e-mail: dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

В рамках стратегии “ФАРМА-2020” перед российскими фармпроизводителями лекарственных средств одной из задач является разработка отечественных биодженериков с целью импортозамещения. Инсулин-гларгин, терапевтический полипептид пролонгированного гликолитического действия, является одним из наиболее важных биодженериков. В данной статье описан системный подход к рациональному дизайну биотехнологических процессов получения таких фармацевтических объектов, как рекомбинантные белки. Использование системного подхода на примере инсулина-гларгина способствовало быстрой и эффективной разработке технологии его получения.

Ключевые слова: системный подход; биофармацевтические продукты; инсулин-гларгин; “апстрим” биопроцесс; “даунстрим” процесс; диаграмма Исикавы.

По данным ВОЗ более 340 млн человек во всем мире больны сахарным диабетом [1]. Развитие биотехнологических методов позволило в последние 10 лет создать и ввести в лечебную практику новые аналоги инсулина человека, обладающие терапевтическими преимуществами перед традиционным инсулином при сохранении полноценной гипогликемической активности. Примером таких внедрений является аналог пролонгированного действия — инсулин-гларгин (ИГ) (коммерческое название “Лантус”). ИГ — полипептид массой около 6060 Да, состоящий из 53 аминокислотных остатков (а.о.) (рис. 1).

Однако на российском рынке препарат на основе ИГ представлен только зарубежными компаниями.

Цель данной работы — использование системного подхода для разработки отечественной технологии получения ИГ, включая этапы наработки биомассы (“апстрим” процесс) и последовательного выделения белка и очистки его от примесей (“даунстрим” процесс). Разработка технологии ИГ является частью стратегии развития фармацевтической отрасли “ФАРМА-2020” [2, 3].

Экспериментальная часть

В качестве продуцента предшественника ИГ использовали бактериальный штамм *E. coli* BL21DE3/pPins07 (ИБХ РАН). Клетки культивировали в условиях, обеспечивающих накопление тел включения гибридного белка-предшественника. Питательная

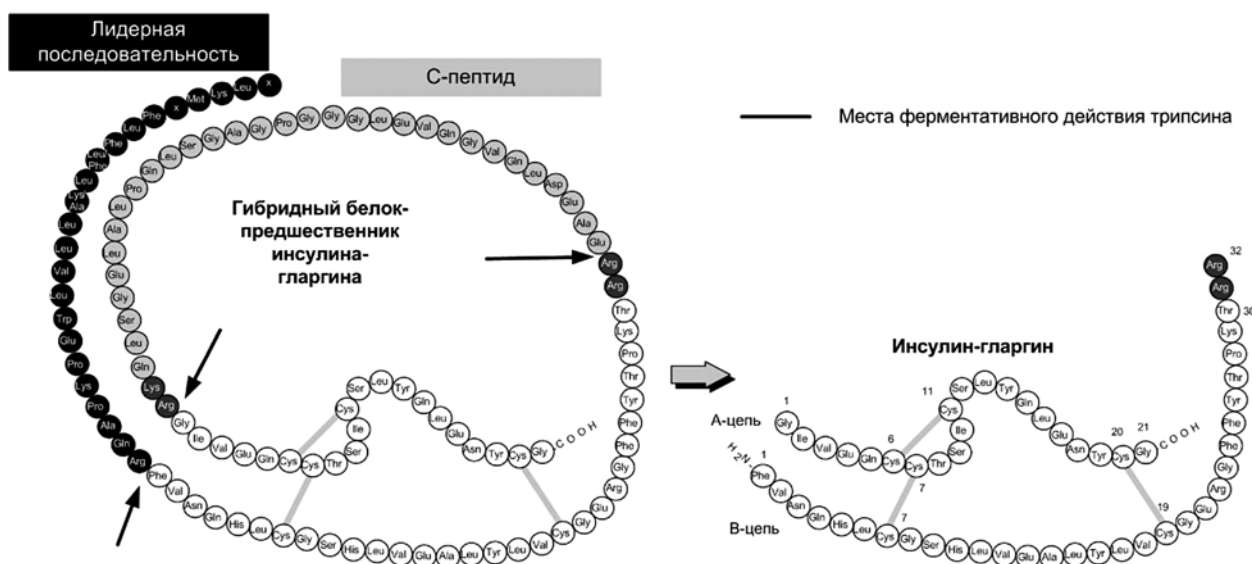


Рис. 1. Схема ферментативного расщепления гибридного белка-предшественника с образованием ИГ.

Критические параметры процесса получения инсулина-гларгина

| Блок | Критические параметры | ИГ |
|-------------------------------|--|--|
| “Апстрим” процесс | Стерилизация среды | фильтрация ч/з 0,2 мкм |
| | pH среды | 6,9 ± 0,1 |
| | Температура биопроцесса, °C | 36 ± 2 |
| | Значение OD на момент индукции, OE | 15 ± 2 |
| | Рабочий объем ферментера, л РО/л ОО | 1100 ± 100/3000 |
| | Скорость перемешивания посевного материала, об/мин | 500 ± 50 |
| | Скорость перемешивания биореактора, Вт/куб. м | 12000 ± 200 |
| | Конечная OD в биореакторе, OE | 40 ± 5 |
| Денатурация/Ренатурация | Количество мочевины (хаотропного агента), М | 8 ± 0,05 |
| | Количество дитиотреитола (тиолатного агента), mM | 10 ± 2 |
| | pH денатурирующего буферного раствора | не ниже 10,0 |
| | Продолжительность, мин | 60 ± 10 |
| | Содержание денатурированного мономера, % (Э-ВЭЖХ) | не менее 50 |
| | Концентрация общего белка, мг/мл (м. Бредфорд) | 35 ± 5 |
| | Коэффициент разбавления при ренатурации | 40 ± 3 |
| | pH ренатурирующего буфера | не ниже 10,0 |
| | Продолжительность ренатурации, ч | 48 ± 5 |
| | Температура ренатурации, °C | 7 ± 3 |
| | Содержание ренатурированного мономера, % (Э-ВЭЖХ) | не менее 30 |
| Процессинг | Концентрация белка, мг/мл (м. Бредфорд) | 9 ± 0,8 |
| | Чистота белка, % (Э-ВЭЖХ) | 85 ± 7 |
| | Соотношение фермент:белок, ед/г | 52 ± 1 |
| | Состав буферного раствора | ДМСО:вода = 40:60 |
| | Температура гидролиза, °C | 5 ± 2 |
| | Продолжительность, ч | 64 ± 1 |
| | Содержание целевого компонента, % (ВЭЖХ) | не ниже 30 |
| Предочистка | Сорбент | DEAE-sepharose FF |
| | Высота сорбента, см | не ниже 30 |
| | Емкость нанесения, мг белка/мл сорбента | 28 ± 2 |
| | Скорость нанесения, см/ч | 300 ± 30 |
| | pH фазы для уравнивания | 8,0 ± 0,1 |
| | pH фазы для элюирования | 8,0 ± 0,1 |
| | Проводимость фазы для уравнивания, мСм/см | не выше 2,5 |
| | Проводимость фазы для элюирования, мСм/см | 10,5 ± 0,5 |
| | Протокол регенерации | 1 М NaOH 1 ч; вода 1 ч, 1 М CH ₃ COOH 2 ч |
| | Концентрация белка, мг/мл (м. Бредфорд) | 9 ± 0,8 |
| Основная очистка | Чистота белка, % (Э-ВЭЖХ) | 85 ± 7 |
| | Сорбент, матрица, размер частиц, мкм | 10 – 16 |
| | Сорбент, матрица, размер пор, нм | 12 ± 2 |
| | Сорбент, тип лиганда | С8 или эквивалент |
| | Высота сорбента, см | не ниже 15 |
| | Емкость нанесения, мг белка/мл сорбента | 15 ± 5 |
| | Скорость элюирования, см/ч | 80 ± 10 |
| | pH фазы для уравнивания | 2,4 ± 0,3 |
| | pH фазы для элюирования | 2,4 ± 0,3 |
| | Состав подвижной фазы для элюирования | этанол, вода для инъекций, лимонная кислота |
| | Градиент этанола, % → % за КО | 10 – 30 за 2 |
| | Общая чистота, % (ВЭЖХ) | не ниже 95 |
| | Бактериальные эндотоксины, ЭЕ/мг (ЛАЛ-тест) | не выше 10 |
| | Высокомолекулярные примеси, % (Э-ВЭЖХ) | не выше 5 |
| | Низкомолекулярные примеси, % (Э-ВЭЖХ) | не выше 5 |
| Родственные примеси, % (ВЭЖХ) | не выше 5 | |
| Финишная очистка | Остаточные белки продуцента, нг/мг (ИФА) | не выше 100 |
| | Остаточная ДНК продуцента, пг/мг (ПЦР) | не выше 100 |
| | Сорбент, матрица, размер пор, нм | 50 ± 10 |
| | Высота сорбента, см | не ниже 44 |
| | Емкость нанесения, мл белка/мл сорбента | 0,06 ± 0,02 |
| | Скорость элюирования, см/ч | 10 ± 5 |
| | pH фазы для уравнивания | 7,8 ± 0,1 |
| | pH фазы для элюирования | 7,8 ± 0,1 |
| | Концентрация белка, мг/мл (ВЭЖХ) | 20 ± 2 |

среда — гидролизат казеина и экстракт пекарских дрожжей. Биореактор рабочий объемом 1000 л. Ферментацию проводили до достижения культурой оптической плотности 15 ОЕ, индуцируя синтез гибридного белка 1-изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозидом. Биомассу клеток собирали центрифугированием, разрушали дезинтеграцией, выделяя тела включения (ТВ). Отмытые ТВ растворяли в денатурирующем буфере (8 М мочевины, 25 мМ трис, 0,5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), pH ≈ 10) с добавлением восстановителя (10 мМ дитиотреитол). Ренатурацию растворенного белка инициировали 40-кратным разбавлением буфером для ренатурации (25 мМ трис, 0,5 мМ ЭДТА), которую проводили в течение 2 сут при температуре + 5 °С. Ренатурированный гибридный предшественник ИГ был получен с концентрацией 0,6 ± 0,1 мг/мл и чистотой 40 ± 8 % по данным внутрипроизводственного контроля — электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГЭ) и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э-ВЭЖХ). ПАГЭ и Э-ВЭЖХ проводили, как описано ранее [4, 5].

Очистку гибридного предшественника проводили с помощью ионообменной хроматографии на сорбенте DEAE-Sepharose FF (GE Healthcare, Швеция). Колонна диаметром 450 мм, объем 50 л. Подвижная фаза — 25 мМ трис в воде очищенной, pH 8,0, градиент хлорида натрия от 0 до 1 М.

В результате предочистки с выходом (65 ± 5) % был получен мономер гибридного предшественника с концентрацией (9 ± 0,8) мг/мл и чистотой (85 ± 7) % по данным внутрипроизводственного контроля (ПАГЭ, Э-ВЭЖХ).

Очищенный на анионите белок-предшественник подвергали ферментативному гидролизу трипсином (Sigma-Aldrich, Германия) с целью получения целевого ИГ (рис. 1).

Гидролиз проводили в водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (40 об. %). Процесс вели при температуре (5 ± 2) °С при медленном перемешивании. Время проведения гидролиза, а также соотношение фермент — субстрат было установлено экспериментально (64 ч и 52 ед/г). ИГ, полученный в результате гидролиза, содержал (40 ± 10) % целевого компонента (остальное — продукты некорректного

гидролиза и не полностью расщепленный гибридный белок).

В качестве основной очистки использовалась обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) на сорбенте KR120-16-C8 (Eka Chemicals Separation A/B, Швеция). Процесс проводили при комнатной температуре. Колонна диаметром 100 мм, объем 3,5 л. Подвижная фаза: 10 мМ лимонная кислота в воде для инъекций, pH 2,3, градиент этилового спирта от 10 до 50 об. %.

По результатам внутрипроизводственного контроля чистота основной фракции ИГ составила (98 ± 0,5) %, выход процесса ОФ ВЭЖХ-очистки (65 ± 10) %.

В качестве финишной очистки использовали гель-фильтрацию на сорбенте Sephadex G-50 M (GE Healthcare, Швеция). Элюат ИГ фильтровали стерильно через фильтр 0,2 мкм, замораживали при – 15 °С и лиофилизировали до сухого состояния (влажность не более 10 %).

Результаты и их обсуждение

Рациональный дизайн биофармацевтического процесса должен включать 4 основных блока: 1) преработка; 2) оптимизация этапов процесса; 3) понимание процесса; 4) квалификация процесса. В ходе “Преработки” изучается природа генно-инженерного белка, его физико-химические свойства, составляется общая схема процесса получения. В блоке “Оптимизация этапов” каждый этап в предложенной схеме изучается детально, с разбиением на стадии. В блоке “Понимание процесса” устанавливаются пределы для выявленных параметров (например, стандартные отклонения значения pH, температур, скоростей потоков и так далее), а также делаются выводы относительно лимитирующих стадий процесса. С помощью диаграммы Исикавы удобно определить связи между этапами и собственно оптимизируемые параметры, выявить наиболее важные (критичные) из них. В финальном блоке проводится квалификация процесса для конкретного генно-инженерного белка, включающая установление тех этапов, которые применимы для выбранного белка, значения оптимальных параметров, с помощью которых можно гарантировать эффективность и воспроизводимость всего процесса.

Рассмотрим подробнее такой системный подход.

Таблица 2

Выходной контроль качества полученной АФС инсулина-гларгина

| Параметр (метод) | Норма* | Полученная АФС |
|---|-------------|----------------|
| Общая чистота, % (ВЭЖХ) | не ниже 95 | 98,73 |
| Бактериальные эндотоксины, ЭЕ/мг (ЛАЛ-тест) | не выше 10 | 0,96 – 1,92 |
| Высокомолекулярные примеси, % (Э-ВЭЖХ) | не выше 5 | 0,13 |
| Низкомолекулярные примеси, % (Э-ВЭЖХ) | не выше 5 | 0,02 |
| Родственные примеси, % (ВЭЖХ) | не выше 5 | 0,6 |
| Остаточные белки продуцента, нг/мг (ИФА) | не выше 100 | 10,5 |
| Остаточная ДНК продуцента, пг/мг (ПЦР) | не выше 100 | 6 |

* European pharmacopoeia 8th edition, monograph 2571 (insulin glargine).

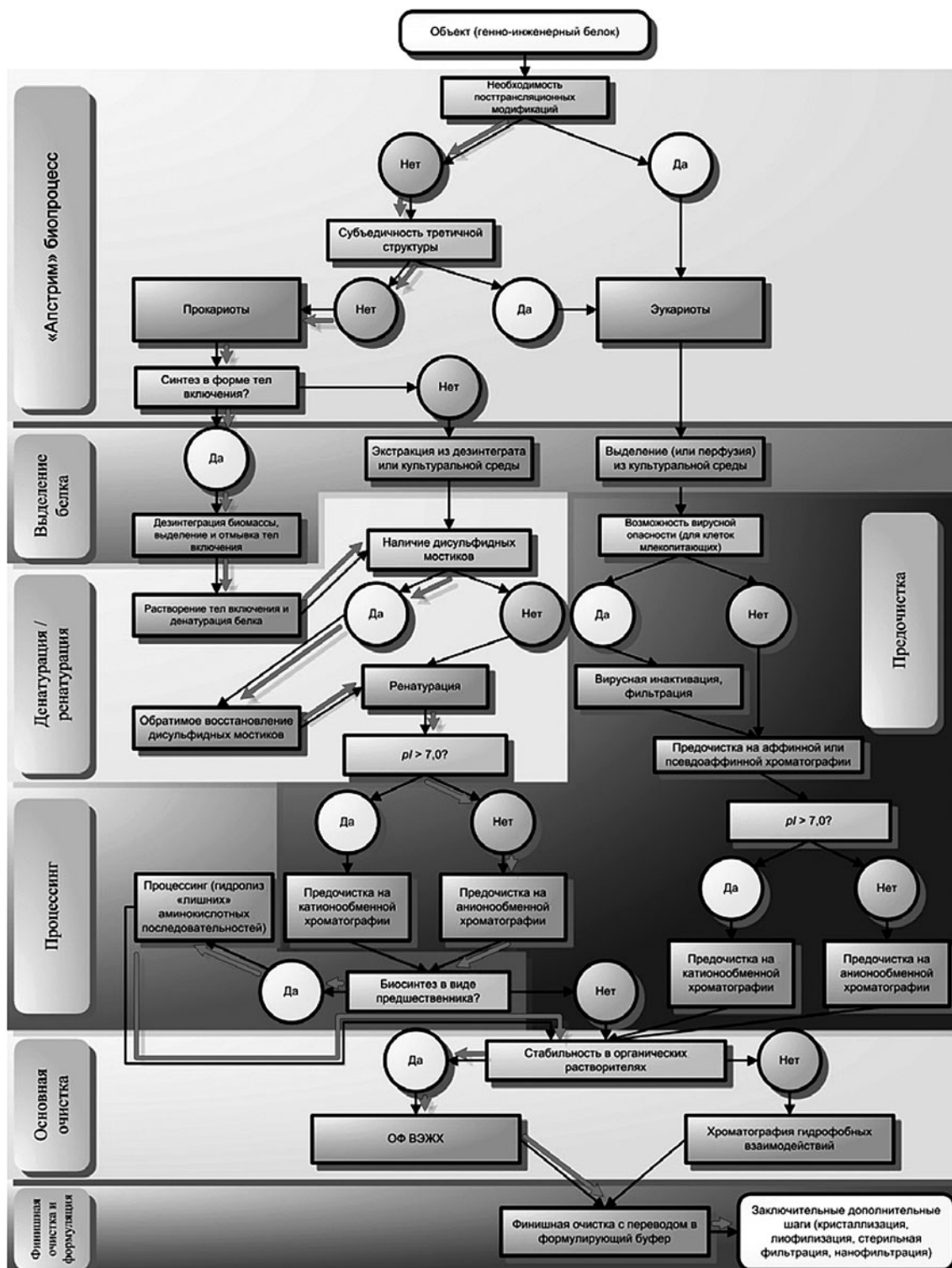


Рис. 2. Блок-схема разработки получения биофармацевтического белка, исходя из его свойств. Путь алгоритма для технологии инсулина-гларгина показан красными стрелками.

1. Предразработка

Нормативные требования к качеству активной фармацевтической субстанции (АФС) (в конечном счете и готовой лекарственной формы) должны быть заложены в спецификацию на этапе проектирования продукта. Центральным элементом проектирования являются: аминокислотный состав терапевтического белка, определяющий свойства объекта исследований, а

также наличие (и их значимость для конечной лекарственной формы) посттрансляционных модификаций. Первое свойство включает такие параметры, как молекулярная масса белка, удельная гидрофобность, значение изоэлектрической точки (рассчитываемое по количеству основных и кислотных а.о.), присутствие цистеиновых а.о. либо в свободной форме, либо замкнутых в дисульфидные связи, а также наличие

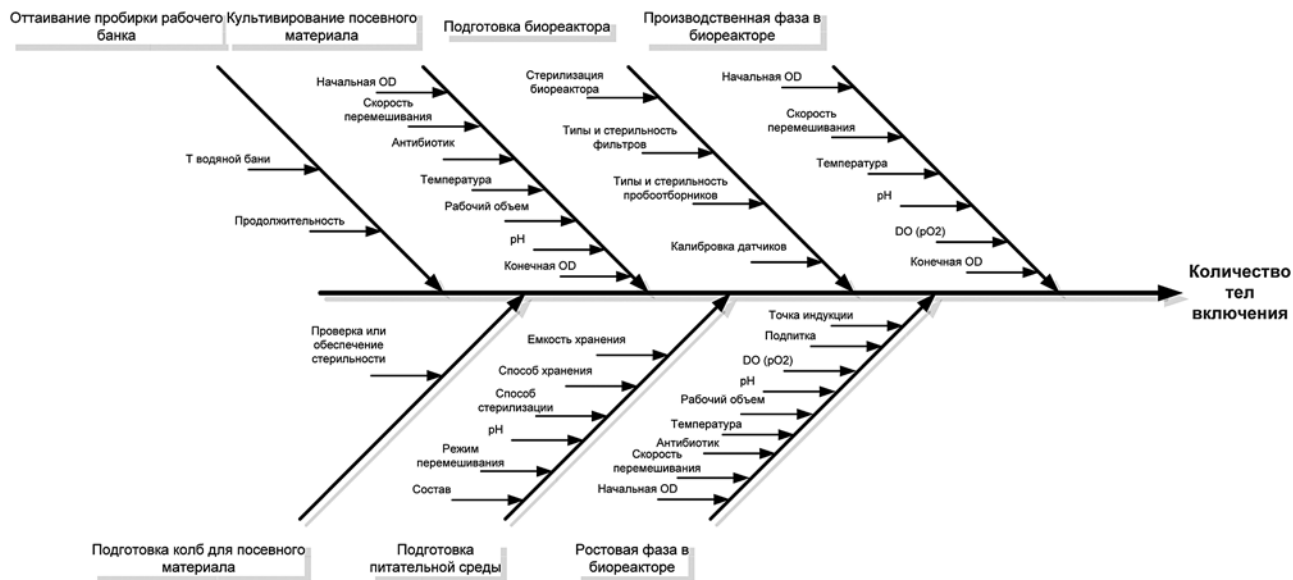


Рис. 3. Диаграмма Исикавы для “апстрим” биопроцесса в прокариотических клетках.

ароматических а.о. Все эти параметры будут определять стратегию “даунстрим” процесса. Второе свойство – посттрансляционные модификации – обосновывает необходимость выбора того или иного продуцента на этапе “апстрим” процесса. Очевидный пример – необходимая степень и вид гликозилирования может быть причиной выбора эукариотического штамма, в то время как отсутствие гликозилирования у изучаемого белка позволяет говорить о выборе прокариотического продуцента.

ИГ – относительно небольшой полипептид (6 кДа), имеющий 3 дисульфидные связи, несубъединичный, не нуждающийся в профиле гликозилирования; изоэлектрическая точка $pI = 6,7$ [6]. Получение ИГ проводится с помощью бактериального “апстрим” процесса. “Даунстрим” процесс включает выделение белка, накапливаемого в клетках в виде тел включения (ТВ), растворение ТВ (сопряженное с денатурацией белка), ренатурацию в нативную конформацию, процессинг “лишних” аминокислотных остатков (а.о.) гибридного предшественника и многостадийную очистку (предочистка, основная и финишная очистки).

2. Оптимизация этапов процесса

Свойства объектов исследования в биофармацевтике определяют выбор стратегий “даунстрим” и “апстрим” процессов. Лучше всего выбор этих стратегий было бы продемонстрировать в виде алгоритмической блок-схемы (рис. 2). Несмотря на некоторые упрощения, эта блок-схема достаточно точно отражает механизм разработки технологии получения любого генно-инженерного белка. Представленный алгоритм учитывает природу биофармацевтического объекта (продукции прокариотическая или эукариотическая), его структурные и физико-химические свойства (есть ли в белке гликозилирование, дисульфидные связи, субъединичен ли он, производится ли в секреторном виде или в виде ТВ, какую имеет изоэлектрическую точку, стабилен ли в органических растворителях и

так далее). Пользуясь этой блок-схемой, гораздо проще предсказать критичные параметры процесса, нуждающиеся в оптимизации.

Для этого удобно воспользоваться диаграммой Исикавы, которая является прекрасным методом для установления причинно-следственных связей и традиционно используется в менеджменте рисков при обеспечении качества на фармацевтическом производстве [7]. Например, при детальном анализе “апстрим” процесса выявляются ряд стадий и соответствующие им параметры (рис. 3). В данном случае показателем эффективности процесса выступает высокое количество тел включения, накопленных в клетках.

Следующий этап процесса – растворение выделенных из клеток и отмытых тел включения (денатурация образующего их белка) с последующим восстановлением третичной структуры (ренатурация или рефолдинг). Выбор состава денатурирующего буфера зависит от структуры белка, а именно наличия дисульфидных связей и свободных цистеиновых а.о. В самых простых случаях, когда в последовательности полипептида нет ни того, ни другого, для растворения тел включения достаточно только сильного хаотропного агента (мочевины или гуанидин гидрохлорида). При наличии дисульфидных связей встает вопрос о необходимости их восстановления тиолатными агентами (бета-меркаптоэтанол, дитиотреитол, дитиозэритриол, цистеин, глутатион и прочее), что учтено в представленной диаграмме Исикавы (рис. 4).

Стратегия ренатурации в общем случае выбирается из 3 способов: прямого разбавления, диафильтрации (или диализа как эквивалента на лабораторном уровне) и хроматографии. В качестве методов контроля денатурации / ренатурации удобно использовать эксклюзионную ВЭЖХ [8], электрофорез (только для ренатурации) и/или метод Бредфорд (для оценки содержания общего белка в растворах).

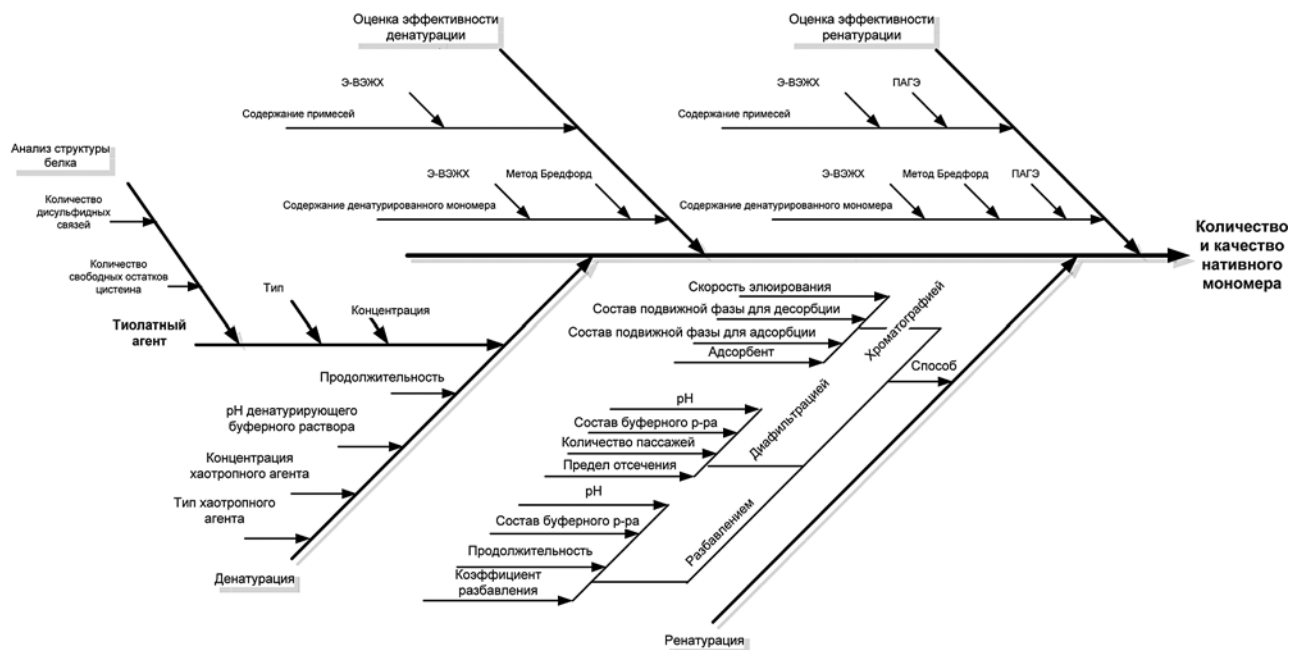


Рис. 4. Диаграмма Исикавы для процедуры денатурации-ренатурации рекомбинантного белка в составе тел включения.

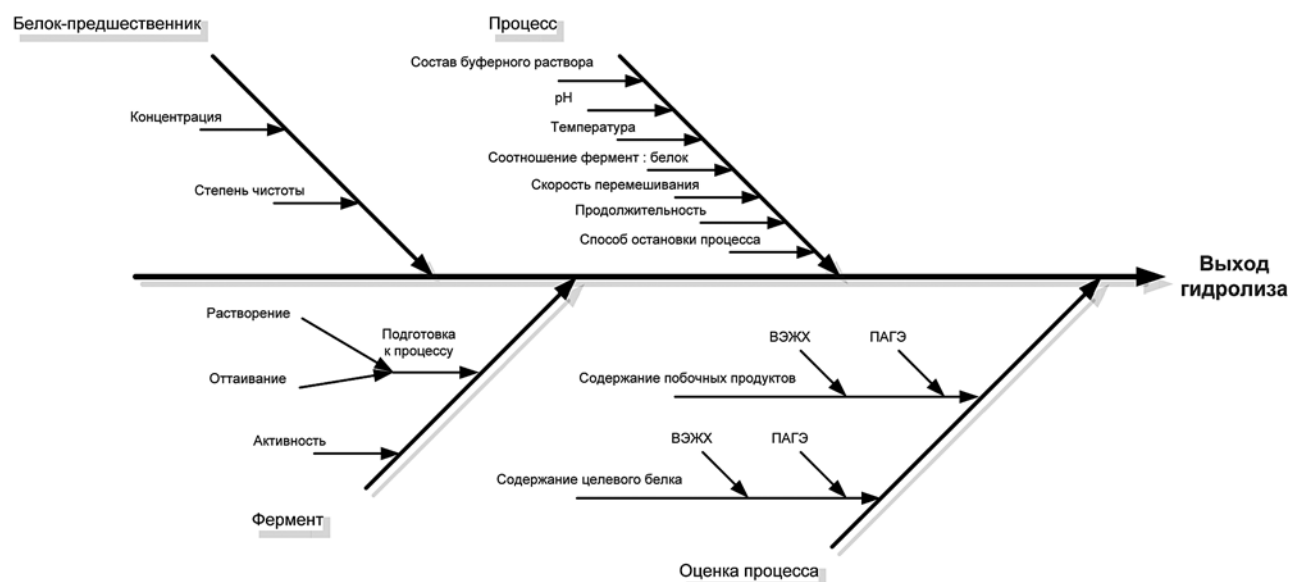


Рис. 5. Диаграмма Исикавы для ферментативного гидролиза белка-предшественника.

Полученный в результате описанных процедур белок представляет собой мономерный гибридный предшественник, в составе которого кроме аминокислотной последовательности целевого полипептида имеются “лишние” последовательности: лидерный фрагмент и С-пептид. Для гидролиза этих “лишних” последовательностей наиболее широко используются соответствующие ферменты. Диаграмма Исикавы учитывает начальный состав реагентов (концентрацию и степень мономерной чистоты белка-предшественника, активность фермента, способ его подготовки к процессу), технологические параметры процесса (состав буферного раствора, включая активаторы и/или ингибиторы фермента, pH гидролизата, скорость перемешивания гидролизной смеси, температу-

ру, соотношение фермент – белок, продолжительность, способ остановки процесса), а также методы контроля за состоянием процесса и оценки его результатов (ВЭЖХ [9], электрофорез) (рис. 5).

Полученный полупродукт является нативным целевым белком, “загрязненным” целым “букетом” различных примесей, к которым относятся побочные продукты гидролиза, остаточный белок-предшественник, белки продуцента (НСП), остаточная ДНК продуцента, бактериальные эндотоксины, высокомолекулярные и низкомолекулярные примеси [10]. В рамках общих рекомендаций (GMP), избавление от этих примесей и получение в результате АФС надлежащего качества должно производиться 3 ортогональными методами. Можно выделить этапы преточистки для минимизации

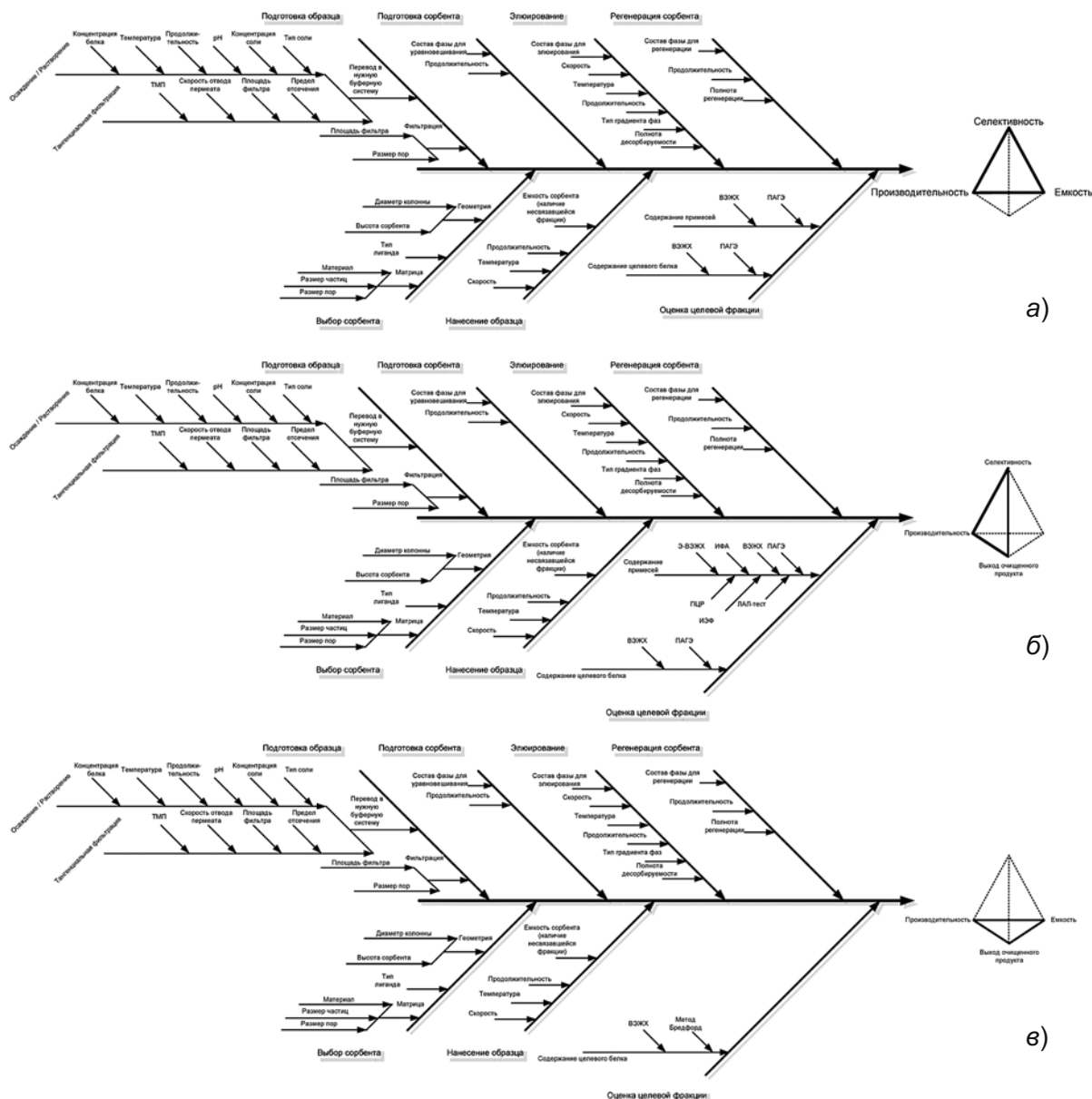


Рис. 6. Диаграммы Исикавы для предочистки (а), основной очистки (б), финишной очистки (в) генно-инженерного белка.

ции примесей, сильно отличных от целевого продукта по физико-химическим свойствам, основной очистки для уменьшения содержания родственных примесей и токсичных компонентов (эндотоксинов, остаточной ДНК и НСР) и финишной очистки для формулирования продукта и избавления от возможных процессуальных примесей (органические растворители, соли, “смытые” с хроматографических смол лиганды и так далее). Во время предочистки основной задачей является получение полупродукта за минимальное время (чтобы избежать его возможных агрегаций и деградаций), поэтому эффективность процесса определяется его скоростью (производительностью), селективностью и емкостью сорбента. При основной очистке важно избавиться от как можно большего количества примесей с минимальными потерями целевого продукта, поэтому эффективность оценивается с позиций селективности, производительности и выхода очищен-

ного продукта. Во время финишной очистки определяющими являются производительность, емкость и выход, так как избавление от процессуальных примесей технологически самый простой и дешевый процесс, который должен быть проведен быстро и без потерь ценного продукта.

Поэтому диаграммы Исикавы для этих 3 этапов во многом похожи (рис. 6). Главное отличие – методы внутрипроизводственного контроля. В случае основной очистки эти методы должны быть максимально разнообразными для того, чтобы оценить степень избавления продукта от примесей и принять решение об эффективности процесса или необходимости корректирующих действий.

3. Понимание процесса

Следующий блок в системном подходе позволяет из всей совокупности параметров выбрать те, оптимизация которых критична, то есть позволяет достичь эф-

фективного и стабильного производства, выпускающего безопасные лекарственные препараты надлежащего уровня качества. Для того чтобы сделать выводы о степени влияния тех или иных параметров на показатели производственного процесса и качество продукта, для каждого этапа можно применить такой метод менеджмента рисков из инструментария системы обеспечения качества, как FMEA [11]. Таким образом можно гарантировать выполнение условия “QbD” или “Качества через разработку” [12], то есть качество финального продукта на этапе разработки, а именно в блоке “Понимание процесса” описываемого в данной статье системного подхода. Присвоение числовых значений критериям (тяжести последствий ошибки, вероятности ее происшествя и обнаружения) основывается на научных знаниях, понимании оборудования и возможностей контроля технологического процесса. По окончании подсчетов FMEA оцениваемые рабочие параметры располагаются в порядке приоритетности. Высокоприоритетные (критичные) параметры нуждаются в тщательной оптимизации, так как определяют эффективность всей производственной технологии.

В отношении технологии получения ИГ был выявлен ряд таких критичных параметров (табл. 1), для них эмпирически найдены оптимальные значения (см. экспериментальную часть) и выявлены стандартные отклонения (или лучше говорить, диапазоны, внутри которых эти параметры приводят к оптимальным результатам).

4. Квалификация процесса

Для квалификации процесса оценивается соответствие готового продукта (АФС) требованию стандартов качества, например, фармакопейным нормам, а также производительность технологии.

Как видно из представленных данных (табл. 2), полученная с помощью разработанной технологии АФС полностью соответствует требованиям фармакопеи.

Выход всего биотехнологического процесса составил примерно 70 г/м³ культуральной жидкости. При расчете на 24 стандартных 1000-литровых промышленных ферментаций производительность технологии составила 1680 г АФС/год. С учетом дозировки (14-МЕ/доза) и активности [13], производительность может быть представлена, как 3,3 млн доз/год.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/>.
2. <http://pharma2020.ru/>.
3. Е. К. Курбанова, Т. Ю. Чулкова, Д. В. Бырихина и др., *Биофарм. ж.*, **4**(3), 21 – 45 (2012).
4. В. Д. Гусарова, А. В. Михалев, Т. В. Воробьева, Д. А. Гусаров, *Биофарм. ж.*, **2**(5), 16 – 24 (2010).
5. V. Gusarova, T. Vorobjeva, D. Gusarov, et al., *J. Chromatogr. A.*, **1176**, 157 – 162 (2007).
6. Д. А. Гусаров, В. Д. Гусарова, А. Ф. Миронов, Д. И. Баирамшвили, *Биофарм. ж.*, **1**(1), 3 – 11 (2009).
7. Д. В. Бырихина, Д. А. Гусаров, Ю. Н. Новиков, *Биофарм. ж.*, **5**(6), 10 – 19 (2013).
8. В. Д. Гусарова, А. В. Михалев, Т. В. Воробьева, Д. А. Гусаров, *Биофарм. ж.*, **2**(5), 16 – 24 (2010).
9. Д. А. Гусаров, Н. С. Брыкова, *Биофарм. ж.*, **2**(6), 29 – 37 (2010).
10. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological / biological products, Q6b, Geneva (1999).
11. R. Fahmy, R. Kona, R. Dandu, et al., *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **4**(13), 1243 – 1254 (2012).
12. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000162.jsp
13. <http://products.sanofi.us/lantus/lantus.html>

Поступила 27.10.14

SYSTEM APPROACH TO DEVELOPING RATIONAL TECHNOLOGY OF THERAPEUTIC PROTEINS (BY EXAMPLE OF INSULIN GLARGINE)

D. A. Gusarov^{1,2*}, D. V. Byrikhina², F. M. Izhaeva^{1,2}, A. I. Gosudarev^{1,2}, P. V. Mikhailov², V. D. Gusarova², T. A. Budy'skaya², A. F. Mironov¹, and V. I. Shvets¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow, 119571 Russia

² N. F. Gamaleya Epidemiology and Microbiology Center, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

* e-mail: dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

The development and production of domestic biogenerics is among the main goals of the Pharma-2020 strategy. Insulin glargine, one of the most important glycolytic polypeptide drugs against diabetes mellitus, is also in the scope of this strategy. This paper describes a rational system approach to designing biopharmaceutical technology of such recombinant proteins. The proposed system approach has been approved by rapid and effective development of insulin glargine production technology.

Keywords: system approach; biopharmaceuticals; insulin glargine; upstream process; downstream process; fish-bone diagram.